

مطالعه پوشش های بسته بندی نانو نقره بر پایه دی اکسید تیتانیوم در تقلیل بار میکروبی کالباس

خشک

زهرا اسدنژاد^b، سید ابراهیم حسینی^a، حامد اهری^{a*}، سید امیرعلی انوار^a

^aاستادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران

^bکارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، تهران، ایران

* Dr.h.ahari@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه با در نظر گرفتن افزایش سرانه مصرف محصولات آماده مصرف مانند سوسیس و کالباس در کشور اهمیت امنیت غذایی و بالا بردن زمان ماندگاری این گونه محصولات از طریق استفاده از پوشش هایی که علاوه بر حفظ کیفیت سبب کاهش بار میکروبی و نگرانی های مربوط به جلوگیری از اتلاف محصول گردد، امری مهم تلقی می شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه از پوشش های حاوی ذرات نانو نقره با درصد های متعدد (۱٪، ۳٪ و ۵٪) بر پایه دی اکسید تیتانیوم جهت بسته بندی کالباس خشک استفاده گردیده شد. در ابتدا جهت بررسی شمارش کلی بار میکروبی، نمونه های بسته بندی عرضه شده در فروشگاه های سوپر پروتئینی شهر تهران (منطقه ۲) به آزمایشگاه میکروبی شناسی مواد غذایی ارسال و آزمون شمارش کلی میکروبی انجام گرفت سپس آزمون میکروبی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مطابق با استاندارد های به شماره ۳-۶۸۰۶ و ۲۹۴۶ سازمان ملی استاندارد ایران بر روی محصولات بسته بندی شده در پوشش های ۱٪، ۳٪ و ۵٪ نانو نقره و نمونه های شاهد عاری از پوشش نانویی انجام گردید. در نهایت جهت تعیین و بررسی میزان رهایش نانو ذرات آزمون شیمیایی مهاجرت انجام شد همچنین به منظور اندازه گیری سایز ذرات، نحوه پراکنش ذرات و بررسی ساختار و مورفولوژی ذرات نانو نقره از میکروسکوپ الکترونی استفاده گردیده شد.

یافته ها: تحلیل نتایج حاکی از آن است که شمارش کلی میکروبی پوشش های بسته بندی رایج در بیشتر تیمارها غیرقابل شمارش گزارش گردید. همچنین آزمون شمارش میکروبی پوشش های نانویی نشان داد در پوشش های حاوی ۵٪ ذرات نانو نقره نسبت به پوشش های ۱٪، ۳٪ و شاهد تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به میزان ۷۸٪ کاهش یافت. نتایج آزمون مهاجرت نیز بیانگر آن است که در مقایسه بین نمونه ها نوع کالباس تأثیری بر میزان رهایش ذرات نانو نقره به محصول نداشته و با افزایش

درصد ذرات نانویی در پوشش ها افزایش میزان رهایش مشاهده گردید. در تمام پوشش های ذکر شده به جزء پوشش ۵٪ که مقدار رهایش ۱ ppm بوده است، مقدار رهایش صفر گزارش گردید. مقدار p_{value} به دست آمده برابر با ۰/۰۳۴ بود.

نتیجه گیری: پوشش نانویی ۵٪ به عنوان کارآمدترین پوشش در جهت کاهش بار میکروبی و افزایش زمان ماندگاری کالباس خشک شناخته شد. نتایج نشان دهنده افزایش زمان ماندگاری کالباس خشک به میزان ۲ برابر بود.

واژه های کلیدی: پوشش نانو ذرات، تقلیل بار میکروبی، کالباس

در سال های اخیر مواد اولیه بسته بندی سلولزی با پلاستیک ها جایگزین شده اند به طوری که پیشرفت و تکامل بسته بندی با پلاستیک ها برای غذا های آماده، غذا های منجمد شده، لبنیات، نوشابه ها، نان و شکلات ضرورت بیشتری پیدا کرده و از نظر میزان مصرف در درجه اول اهمیت قرار دارد در این راستا از میان مواد پلاستیکی پلی اتیلن ها و پلی پروپیلن ها (همو و کوپلیمرها) به عنوان لایه ای در تماس با ماده غذایی در بسته بندی های تک لایه، چندلایه و ساختار کواکستروود شده ترجیح داده می شوند چرا که این پوشش ها جزء مواد شیمیایی با پایداری خوب هستند، حداقل واکنش را با بیش تر غذاها دارند، محافظ های خوبی برای رطوبت بوده و قابلیت دوخت حرارتی داشته و مقادیر کمی از باقی مانده حلال ها، مونومرها، پلاستی سائزرها، ممانعت کننده ها و یا مواد آزاد شده از قالبها ممکن است وارد غذاهای بسته بندی شده گردیده و ترکیبات آرومایی محصول نمی تواند به بسته بندی نفوذ کنند (Tankhiwale & Bajpai, 2012, Huang & Chen, 2012).

امروزه در صنعت بسته بندی مواد غذایی از نوعی پوشش های پلاستیکی استفاده می شود که در تولید این پلاستیک ها از فناوری نانو ذرات استفاده می شود. از آنجا که اکسیژن مسئله سازترین عامل در بسته بندی مواد غذایی است (این عنصر باعث فساد چربی مواد غذایی و همچنین تغییر رنگ آنها می شود) در این پلاستیک جدید نانو ذرات به صورت زیگزاگ قرار گرفته اند و مانند سدی مانع از نفوذ اکسیژن می شوند به بیان دیگر مسیری که گاز باید برای ورود به بسته طی کند طولانی می شود به همین دلیل مواد غذایی در این بسته ها تازگی خود را بیشتر حفظ می کنند در واقع با طولانی کردن مسیر حرکت مولکول های اکسیژن مواد غذایی دیرتر فاسد می شوند (Busolo et al., 2010, Gezgin et al., 2013) در همین راستا با استفاده از نانو ذرات نقره در داخل پلاستیک های معمولی که به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا و بالا بودن تعداد زیادی از اتم های فلز در واحد سطح تماس بهتری با میکروارگانیسم ها داشته و به عنوان ماده ضد میکروبی مؤثر علیه باکتری ها، ویروس ها و سایر میکروارگانیسم ها به کار می رود می توان پوشش هایی تولید نمود که زمان ماندگاری مواد غذایی را افزایش و میزان بار میکروبی آنها را کاهش دهد (Martinez-Abad et al. 2012).

Timothy در سال ۲۰۱۱، چندین کاربرد نانو مواد در بسته بندی مواد غذایی و ایمنی مواد غذایی را مورد بررسی قرار داد. از جمله: نانوکامپوزیت های پلیمر بر پایه خاک رس به عنوان مواد بسته بندی ممانعت کننده، نانو ذرات نقره به عنوان عوامل ضد میکروبی قوی و نانوحس گر ها و نانو مواد سنجشی جهت تشخیص آنالیت های مرتبط با مواد غذایی (گازها، مولکولهای آلی کوچک و پاتوژن های منتقله از راه مواد غذایی). این نوع کاربردها به این دلیل که در

آن ها نانو ذرات به طور مستقیم به غذاهای مصرفی افزوده نمی شدند انتخاب شده و در نتیجه بازار پسندی بیشتری در کوتاه مدت توسط مشتری داشتند (Timothy, 2011).

بر اساس گزارش فائو سالانه بین ۳۰-۵۰٪ از مواد غذایی در جهان به علت نامناسب بودن بسته بندی، مواد اولیه، حمل و نقل و شرایط نگهداری دور ریخته می شود. در ایران نیز بر اساس گفته شاهرخ ظهیری (رییس کمیسیون کشاورزی و صنایع غذایی اتاق تهران) حدود ۴۰٪ از محصولات غذایی از بین می رود که می توان با استفاده از صنایع تبدیلی این مسئله را حل نمود (www.mashreghnews.ir, 31.2.93). در این میان بیشترین سهم دور ریز را بسته بندی هایی دارند که به علت نامناسب بودن سبب غیرقابل مصرف بودن و فساد ماده غذایی گشته که در نتیجه میزان ضایعات افزایش می یابد. بسته بندی بر دیگر عوامل دور ریز ماده غذایی نیز مؤثر است بر همین اساس می توان با استفاده از بسته بندی هایی که شرایط نگهداری را بهبود بخشد کیفیت و زمان ماندگاری ماده غذایی را افزایش و میزان ضایعات را کاهش داد از طرفی امروزه ایمنی غذاها یک مسأله بزرگ به شمار می آید و ضروری است به هنگام استفاده سلامت مصرف کننده را به مخاطره نیندازد از این رو در جهت بهبود کیفیت مواد غذایی بسته بندی هایی تحت عنوان بسته بندی ضد میکروبی با خواص ممانعت کنندگی تولید و به بازار عرضه شده و توانایی نابود کردن یا جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسم های پاتوژن موجود در غذاها را با اضافه کردن عوامل ضد میکروبی به سیستم بسته بندی دارا هستند (Busolo et al, 2010). بدین ترتیب زمانی که سیستم بسته بندی دارای فعالیت ضد میکروبی باشد خود سیستم از طریق افزایش زمان تأخیر و کاهش عمر میکروارگانیسم ها از رشد میکروب ها جلوگیری می کند علاوه بر این بسته بندی های ضد میکروبی طراحی می شوند تا میکروارگانیسم هایی که مخالف اهداف بسته بندی مانند افزایش زمان ماندگاری، حفظ کردن کیفیت و تضمین سلامتی را انجام می دهند کنترل کنند از این رو بسته بندی های ضد میکروبی تضمین خوبی برای تأمین امنیت غذایی به شمار می روند چرا که از طریق فعالیت هایی متفاوت باعث تأثیرات مختلف بر میکروارگانیسم ها می شود و این عمل را به واسطه خصوصیات ضد میکروبی و فیزیولوژی مختلف میکروارگانیسم انجام می دهند. (Akbar & Anil Kumar, 2014)

Gottesman و همکاران در سال ۲۰۱۱، نمونه هایی از کاغذ را با نانو ذرات AgNP پوشش دادند. نمونه های غوطه ور شده در محلول $AgNO_3$ را در سوسپانسیونی از اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس انکوبه گذاری نمودند. پس از ۴ روز نمونه ها فعالیت بالایی بر علیه هر دو میکروارگانیسم از خود نشان دادند (Gottesman, 2011).

Patiño و همکاران در سال ۲۰۱۳، فعالیت ضد میکروبی ذرات نقره-روی را در پوشش های کامپوزیت پلی آمید (PA-6) در بسته بندی سوسیس مورد مطالعه قرار دادند. پوشش های فعال با اضافه کردن ۳٪ (w/w) ذرات

نقره-روی با هدف به دست آوردن یک فیلم با ممانعت کنندگی و خواص مکانیکی خوب تولید شدند که ذرات نقره-روی رشد گونه های مختلف میکروبی از جمله سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028) را مهار کردند از طرف دیگر گنجاندن ذرات نقره-روی در فیلم های PA-6 خواص مکانیکی را تغییر نداده و مقدار انتقال اکسیژن فیلم ها را کاهش داد (Patiño et al, 2013).

Kumar Anal & Akbar در سال ۲۰۱۴، اثر بسته بندی فعال نانوذرات اکسید روی را در برابر سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت مرغ آماده مصرف مورد مطالعه قرار دادند. فیلم های فعال نانوذرات اکسید روی در برابر دو پاتوژن ناشی از مواد غذایی برجسته: سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس بسیار موثر واقع شده و تعداد باکتری های هدف آلوده در مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری در دمای 1 ± 8 درجه سانتیگراد از هفت به صفر log کاهش یافت (Kumar Anal & Akbar, 2014).

امامی فر و همکاران در سال ۱۳۹۰، فیلم های کامپوزیتی از Ag، LDPE و ZnO تهیه کردند و برای بسته بندی آب پرتقال تازه و استریل شده به کار بردند. این آب پرتقال با استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم تلقیح شد. بسته ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای ۱۱۲ روز نگهداری شدند و جمعیت میکروبی آن بررسی و مشخص شد که جمعیت میکروبی در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) به صورت معنی داری کاهش نشان دادند (امامی فر و همکاران، ۱۳۹۰).

فروغی و همکاران در سال ۱۳۹۰، اثر پوشش های نانو در افزایش عمر ماندگاری فرآورده گوشتی سوسیس کوکتل را بررسی کردند. پارامترهای رنگ، مزه، قوام، وضعیت ظاهری و بو در دو نمونه شاهد و نمونه گروه آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد نمونه های بسته بندی شده با نانو حتی پس از انقضاء تاریخ مصرف نیز دارای ظاهر مناسب و رنگ شفاف و قابل مصرف بودند و نمونه های شاهد پس از انقضاء تاریخ مصرف قابل استفاده نبوده و بوی بسیار نامناسب و رنگ تیره و کدر و پوشش چروکیده داشتند (فروغی و همکاران، ۱۳۹۰).

شریفی سلطانی و همکاران در سال ۱۳۹۱، اثر ضد میکروبی بسته بندی نانو نقره بر فیله مرغ در دمای یخچال و فریزر (1 ± 3 درجه سانتیگراد) را مورد مطالعه قرار دادند. نمونه ها برای باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در روزهای ۱، ۳، ۷، ۱۰ و ۱۴ مورد بررسی قرار گرفت که شمارش میکروبی نشان داد بسته بندی نانو نقره سبب کاهش رشد میکروبی فیله مرغ گشته و عمر مفید از ۲ روز در بسته بندی مواد غذایی رایج با نمرات قابل قبول مشابه در نمونه های بسته بندی نانو نقره تا ۷ روز تمدید شد (شریفی سلطانی و همکاران، ۱۳۹۱).

اگر چه ممکن است استفاده از پوشش های بسته بندی نانو موجب افزایش زمان ماندگاری محصول شده و بدین واسطه هزینه نهایی تولید و مصرف کننده را کاهش دهد ولی این نکته حائز اهمیت است که به هنگام استفاده سلامت مصرف کننده را به مخاطره نیندازد که این امر با بررسی رهایش ذرات نانو نقره به محصول و یا عدم رهایش آنها انجام می پذیرد (Huang & Chen, 2012).

اهری و همکاران در سال ۱۳۹۱، اثر نانوذرات نقره بر زمان ماندگاری زعفران ایرانی با استفاده از پوشش های بسته بندی نانو SNP 103.3 بر خواص میکروبی و رهایش ذرات نانو به محصول نهایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد یکی از انواع پوشش های ۰، ۳، ۵٪ معادل ۴۰۰۰ ppm توانست بار میکروبی را تا ۹۸٪ تقلیل دهد همچنین عدم رها سازی ذرات نانو به محصول بسته بندی شده نهایی بررسی و میزان رهایش گروه های تحت آزمایش معادل صفر ppm گزارش شد. علاوه بر این میزان باقی ماندگی ذرات نانو در محصول بسته بندی شده نهایی بعد از زمان های ۱، ۲ و ۳ ماه بررسی و نتایج حاکی از باقی ماندگی کمتر از ۱ ppm در نمونه های تهیه شده بود. نانومتريک بودن ذرات نقره مصرفی در پوشش ها اندازه اثرگذاری میکروبی را افزایش داده و سبب افزایش زمان ماندگاری بیشتر محصول گردید (اهری و همکاران، ۱۳۹۱).

در حال حاضر با توجه به افزایش تمایل مصرف کنندگان به فراورده هایی از قبیل سوسیس و کالباس و اهمیت امنیت غذایی در استفاده از پوشش هایی برای این محصولات که علاوه بر حفظ کیفیت این نوع فراورده ها سبب کاهش بار میکروبی شده، نگرانی های مربوط به چگونگی جلوگیری از اتلاف محصول را کاهش داده و اهداف اصلی کارخانجات صنایع غذایی در خصوص افزایش زمان ماندگاری محصولات تولیدی را تأمین نماید از جمله دلایل تشویق کننده ضرورت انجام این تحقیق و بررسی کاربری پوشش های حاوی ذرات نانو نقره در کالباس خشک جهت پاسخگویی به این قبیل نیازها بوده است.

مواد و روش ها

نمونه های کالباس ۶۰، ۷۰ و ۸۰٪ (از هر نمونه ۱۰ عدد و جمعا ۳۰ نمونه در ۲ تیمار) از فروشگاه های منطقه ۲ تهران، پوشش های بسته بندی نانو ۱، ۳ و ۵٪، محلول اسید استیک، محلول استونیتریل، محیط کشت پلیت کانت آگار، نوترینت برات و مکانکی آگار و همچنین سوش باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 و اشريشيا کلي ATCC 25922 تهیه گردید. رقت سازی و انجام آزمون شمارش کلی باکتری ها، آماده سازی محیط ها و کشت باکتری ها و آزمون میکروبی پوشش های نانو، آزمون بررسی مهاجرت ذرات نانو به ماده غذایی و بررسی ساختار ذرات نانو توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت.

آزمون شمارش کلی میکروبی پوشش های رایج

بدین منظور بر اساس استاندارد ملی ۵۲۷۲، ۱۰ گرم از نمونه پوشش بسته بندی با ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده (سرم فیزیولوژی) مخلوط، همگن و به دوسری پتری دیش یک میلی لیتر از رقت های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} و 10^{-5} منتقل گردید سپس محیط کشت پلیت کانت آگار تهیه و در اتوکلاو قرار گرفت. محیط کشت ذوب شد و در دمای ۴۴-۴۶ درجه سانتیگراد به پلیت ها اضافه گردید و به روش پور پلیت^۱ (همزنی به صورت هشت انگلیسی ۵ بار در جهت عقربه های ساعت و ۵ بار خلاف جهت آن) کشت داده شد. پس از بستن نمونه پلیت وارونه و در دمای ۳۱-۲۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید.

آزمون شمارش میکروبی پوشش های نانو

به منظور کوت کردن باکتری ها بر روی پوشش های نانویی ابتدا پوشش های بسته بندی حاوی ۱٪، ۳٪ و ۵٪ ذرات نانو نقره به تعداد تیمارها (از هر نمونه ۴ برش برای هر باکتری ۲ نمونه) در ابعاد ۶*۶ سانتیمتر به وسیله قیچی برش داده شده سپس جهت استریل نمودن در اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه) قرار داده شدند. لازم به ذکر است به منظور جلوگیری از اتصال و چسبیدن پوشش ها به یکدیگر از برگه های کاغذ صافی بین پوشش های بسته بندی استفاده گردید. سپس مطابق با استاندارد های ملی ۲۹۴۶ و ۶۸۰۶ سوش باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بر روی محیط کشت مکانکی آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای 37 ± 2 درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیدند پس از آن به لوله های حاوی محیط کشت نوترینت برات انتقال داده و به خوبی مخلوط شدند. رقت 10^{-2} از اولین سوسپانسیون تهیه شده که معادل 10^6 می باشد آماده گردید. از سوسپانسیون باکتری ها به صورت جداگانه به مقدار ۳ ml بر روی نمونه های تحت آزمون (پوشش نانو به ابعاد ۶*۶) ریخته شد. نمونه های حامل سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کاملاً استریل قرار گرفتند سپس مدت زمان ۶-۴ ساعت برای تماس نمونه با محیط کشت پلیت کانت آگار اختصاص داده شد تا سوسپانسیون روی نمونه ها به محیط کشت انتقال داده شده و کاملاً جذب محیط گردد. بعد از زمان سپری شده نمونه ها از پتری های حاوی محیط کشت خارج گردید و پتری ها به صورت در بسته و خالی آماده مرحله بعدی شدند سپس پتری های تحت آزمون در دمای 37 ± 2 درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در شرایط کنترل شده گرمخانه گذاری گردیده و در نهایت شمارش باکتری ها انجام گرفت.

آزمون شمارش میکروبی نمونه کالباس

¹. Pour plate method

در ابتدا جهت تهیه رقت مطابق با استاندارد های ملی شماره ۵۲۷۲ و ۸۹۲۳-۲، ۱۰ گرم از نمونه های کالباس خشک توزین و سپس ۹۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده استریل (سرم فیزیولوژی) افزوده، مخلوطی یکنواخت از نمونه تهیه شد. سپس به منظور شمارش کلی باکتری ها با استفاده از روش کشت آمیختنی (پور پلیت) و به شکل دوتایی با به کارگیری محیط کشت پلیت کانت آگار اقدام به کشت از نمونه ها گردید و پلیت های کشت شده در دمای ۳۱-۲۹ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس نتیجه آزمایش ها بررسی و تمام کلنی های ظاهر شده در پلیت های مناسب انتخاب شده، شمارش گردیدند.

شمارش کلی میکروبی نمونه کالباس بسته بندی شده در پوشش های نانو

در ابتدا سطح کالباس با پنبه آغشته به الکل تمیز شده، با اسکاپل جراحی قطعاتی از کالباس جدا و وزن گردیده سپس در کنار شعله به وسیله پنس استریل قطعات کالباس روی پوشش های حاوی ۱٪، ۳٪ و ۵٪ ذرات نانو نقره و نمونه شاهد در پوشش عاری از ذرات نانو قرار گرفته و به صورت کامل بسته بندی و در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۲ روز باکتری ها شمارش شدند.

به منظور شمارش باکتری مطابق با استاندارد ملی به شماره ۸۹۲۳-۲ محیط کشت پلیت کانت آگار تهیه شده و از نمونه پوشش های ۱٪، ۳٪ و ۵٪ (هر کدام ۲ نمونه) حاوی کالباس خشک از یخچال برداشته و ۱ گرم کالباس با ۹ میلی لیتر پپتون واتر به صورت هموزن در آمد. رقت های مورد نیاز تهیه شد. میزان ۱ میلی لیتر از هر رقت در پلیت قرار گرفت و محیط پلیت کانت آگار به روش کشت آمیختنی (پور پلیت) افزوده شد. شمارش باکتری ها پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای 2 ± 37 درجه سانتیگراد انجام شد.

آزمون شیمیایی مهاجرت به روش آزمون با مشابه اسید استیک

اساس مهاجرت استاندارد EN- 1186 است که مهاجرت اجزایی از داخل بسته بندی پلیمری به داخل ماده غذایی که در تماس مستقیم با پلیمر بسته بندی قرار دارد را نشان می دهد. در مهاجرت کلی فقط میزان ماده بسته بندی که به داخل ماده غذایی نفوذ کرده اندازه گیری می شود (Huang and Chen, 2012, Song et al., 2011).

به منظور انجام این آزمون یک سطح مشخص از فیلم های ۱٪، ۳٪ و ۵٪ با دستگاه دوخت حرارتی به شکل پاکت های بسته بندی دوخت شده اند و محلول اسید استیک ۳٪ (مشابه غذایی) پس از انتقال به پاکت ها در انکوباتور ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ روز قرار گرفت. وزن یک کروزه کوارتزی که به مدت یک ساعت در آون

۱۰۵ درجه سانتیگراد قرار گرفته بود پس از خنک شدن و تثبیت وزن در دسیکاتور یادداشت گردید و مشابه غذایی از پاکت ها به داخل کروزه ریخته شد و کروزه روی هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد زیر هود تا زمانی که ۱ میلی لیتر مشابه غذایی در کروزه باقی بماند به آرامی تبخیر گردید. سپس کروزه از روی هیتر برداشته شد، ۱-۲ ساعت داخل آون قرار گرفت تا ۱ میلی لیتر مشابه غذایی باقی مانده نیز تبخیر شود و رطوبت به حداقل میزان برسد سپس وزن کروزه خشک و خنک شده در دسیکاتور یادداشت گردید. اختلاف وزن ۲ کروزه، مقدار ماده ای است که از داخل بسته بندی پلیمری به داخل مشابه غذایی مهاجرت کرده که اسید تبخیر شده می باشد (فرمول ۱). اختلاف وزن ۲ کروزه بر حسب گرم به دست می آید. سطحی از پلیمر که در مجاورت مشابه غذایی قرار دارد، اندازه گیری می شود و مساحت بر حسب سانتیمتر مربع اندازه گیری می شود. واحد $\frac{gr}{cm^2}$ باید بر حسب $\frac{mg}{dm^2}$ گزارش گردد. حداکثر میزان مهاجرت $10 \frac{mg}{dm^2}$ است (اهری و همکاران، ۱۳۹۱).

فرمول ۱:

$$\text{میزان مهاجرت} = \frac{\text{وزن اولیه کروزه} - \text{وزن ثانویه کروزه}}{\text{سطح تماس مشابه غذایی با بسته بندی}} * 100000$$

بررسی پراکنش ذرات با میکروسکوپ الکترونی

ابتدا آماده سازی نمونه های پوشش بسته بندی در درصد های ۱، ۳، و ۵٪ از طریق تهیه سوسپانسیون در حلال استونیتریل در فالكون های آزمایشگاهی انجام و مقدار ۳ سی سی از محلول حاصله را روی پایه دارای چسب گذارده تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه اسپاترکوتر^۲ که حاوی گاز آرگون جهت تثبیت روکش آب طلا به روی نمونه های موجود برپایه می باشد قرار داده شد سپس نمونه ها پس از ۱۰ دقیقه (نمونه های آماده شده دارای روکش طلا) به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یافته و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ SEM بر روی بزرگنمایی 10 X تصاویر نمونه به روی مانیتور ظاهر گردید (اهری و همکاران، ۱۳۹۱).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این بررسی بر پایه طرح ساده تصادفی به وسیله نرم افزار SPSS19 تجزیه و تحلیل و جهت بررسی معنا داری از آزمون کروسکال والیس و آزمون من ویتنی استفاده گردید.

یافته ها

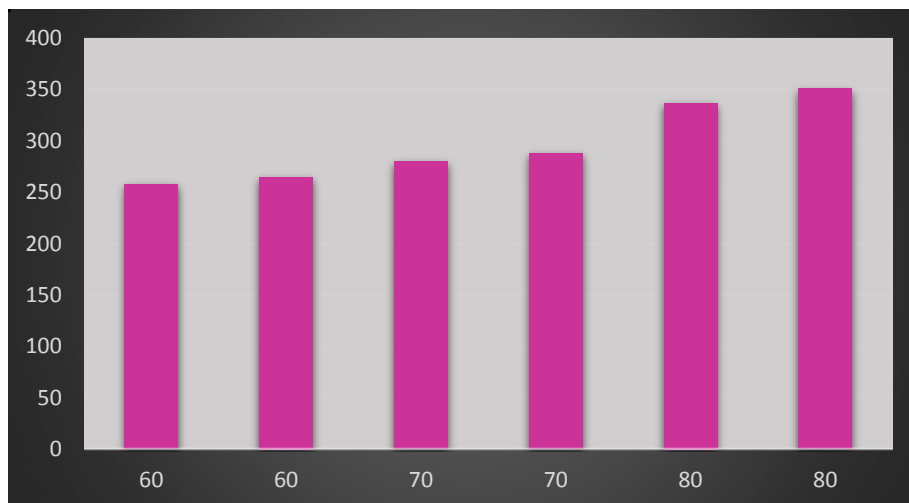
². Spotter Coater

نمودار ۱ نتایج شمارش کلی میکروبی پوشش های رایج نشان از آن داشت که جمعیت میکروبی این بسته بندی ها بالا بوده و با افزایش درصد خلوص کالباس میزان بار میکروبی نیز افزایش یافته است (ممکن است به دلیل آلودگی گوشت های مصرفی باشد).

جدول ۱ شمارش کلی میکروبی پوشش های بسته بندی ۳٪ و ۵٪ نانو نقره در گروه استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشیاکلی را نشان می دهد. نتایج حاکی از آن است که شمارش میکروبی در پوشش ۳٪ و ۵٪ بین باکتری های اشريشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارای تفاوت معنی داری ($p < 0/05$) می باشد.

جدول ۲ بررسی رهایش ذرات نانو نقره از پوشش های مختلف و میزان باقی ماندگی در کالباس های ۶۰٪، ۷۰٪ و ۸۰٪ نشان می دهد. یافته ها حاکی از آن است که میزان باقی ماندگی ذرات نانو در کالباس در پوشش های ۱٪، ۳٪ و ۵٪ تفاوت معنی دار با هم ($p < 0/05$) دارد به طوری که میزان باقی ماندگی ذرات نانو وابسته به درصد ماده مؤثره پوشش های نانو می باشد و از نوع کالباس تأثیر نمی پذیرد بنابراین پوشش ۵٪ دارای بیشترین میزان رهایش و پوشش ۱٪ دارای کمترین میزان رهایش بود.

نمودار های ۳ و ۲ میزان باقی ماندگی ذرات نانو نقره در نمونه های حاوی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشیاکلی که جمعیت میکروبی بالایی داشتند (نمونه های اوت شده) را پس از ۴۵ روز مجاورت دهی نشان می دهند. نتایج نشان از آن داشت بیشترین میزان باقی ماندگی مربوط به پوشش های حاوی ۵٪ ذرات نانو نقره در مقایسه با پوشش های حاوی ۱٪ و ۳٪ ذرات نانو نقره بوده است. این نتیجه نمایانگر آن است افزایش درصد ذرات نانو در بسته بندی ها سبب افزایش میزان رهایش این ذرات به محصول بسته بندی شده می گردد. با این حال میزان باقی ماندگی ذرات نانو نقره گزارش شده در پوشش های نانویی ۵٪ اثرات سوئی بر سلامتی انسان ندارد.



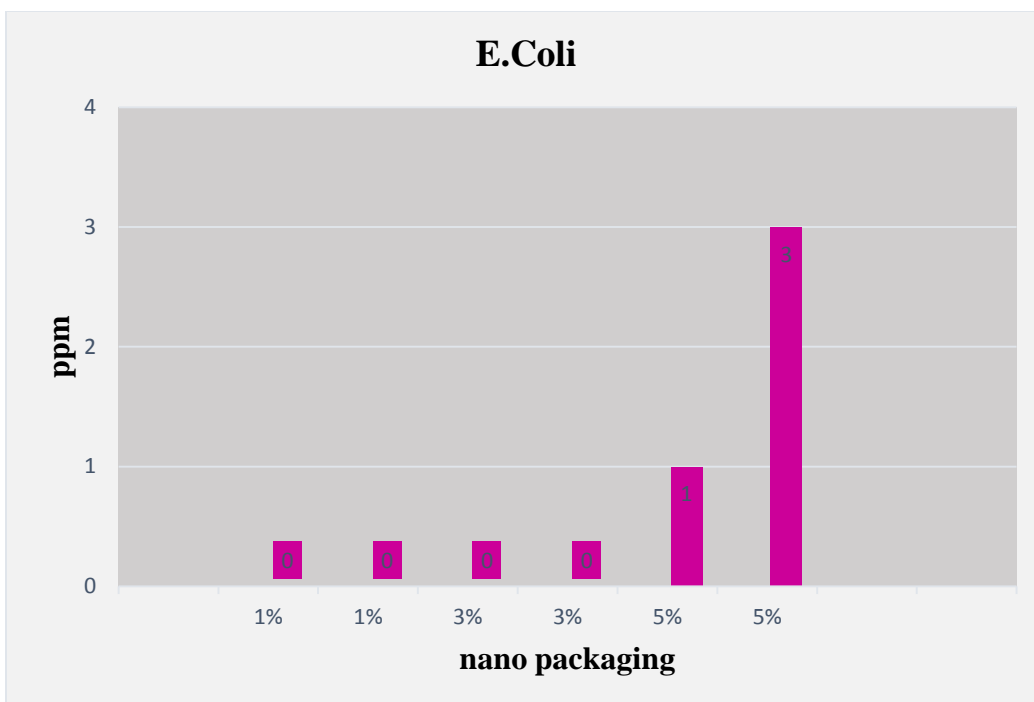
نمودار ۱- شمارش کلی میکروبی پوشش رایج کالباس (۶۰٪، ۷۰٪ و ۸۰٪)

جدول ۱- شمارش میکروبی پوشش های بسته بندی ۳٪ و ۵٪ در گروه استاف اورئوس و اشریشیاکلی

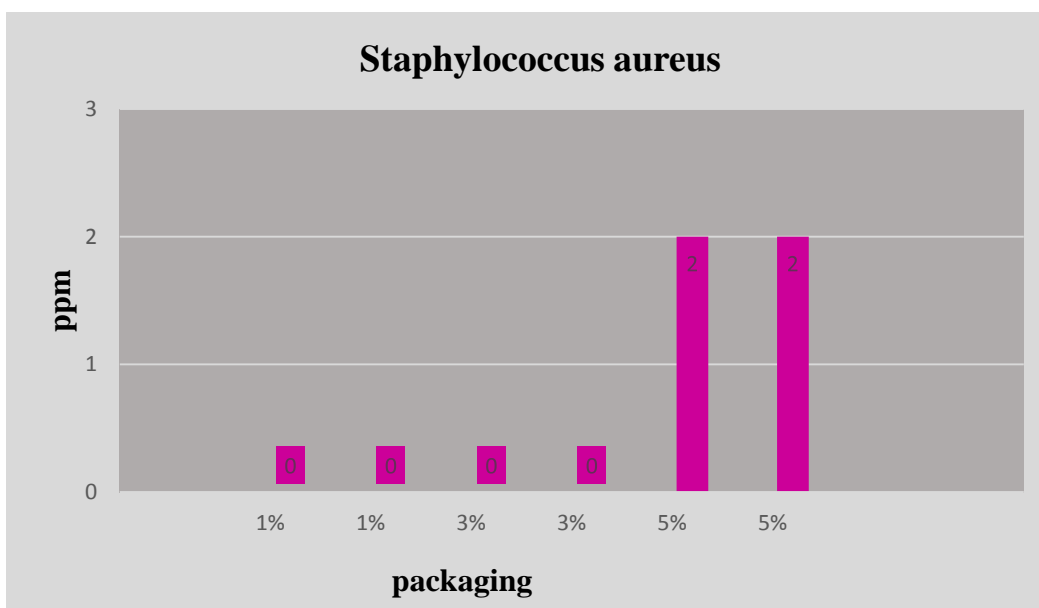
مقدار Pvalue	پوشش بسته بندی حاوی ذرات نانو نقره
۰/۰۲۵	پوشش بسته بندی ۳٪ نانو نقره
۰/۰۲۵	پوشش بسته بندی ۵٪ نانو نقره

جدول ۲- بررسی میزان باقی ماندگی ذرات نانو نقره در پوشش های مختلف (کالباس ۶۰٪، ۷۰٪ و ۸۰٪)

مقدار Pvalue	نوع کالباس
۰/۰۱۸	کالباس ۶۰٪
۰/۰۱۸	کالباس ۷۰٪
۰/۰۱۸	کالباس ۸۰٪



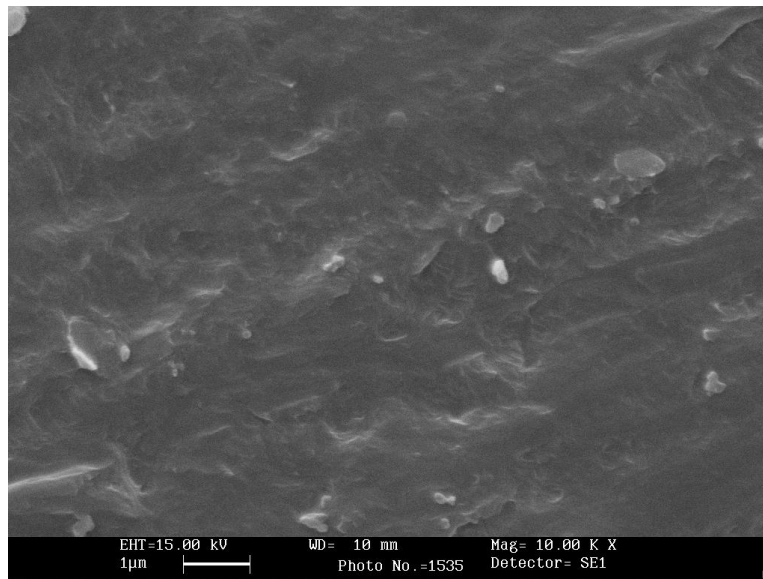
نمودار ۲- مقایسه پوشش های نانویی در میزان باقی ماندگی ذرات نانو از نظر باکتری اشرشیاکلی



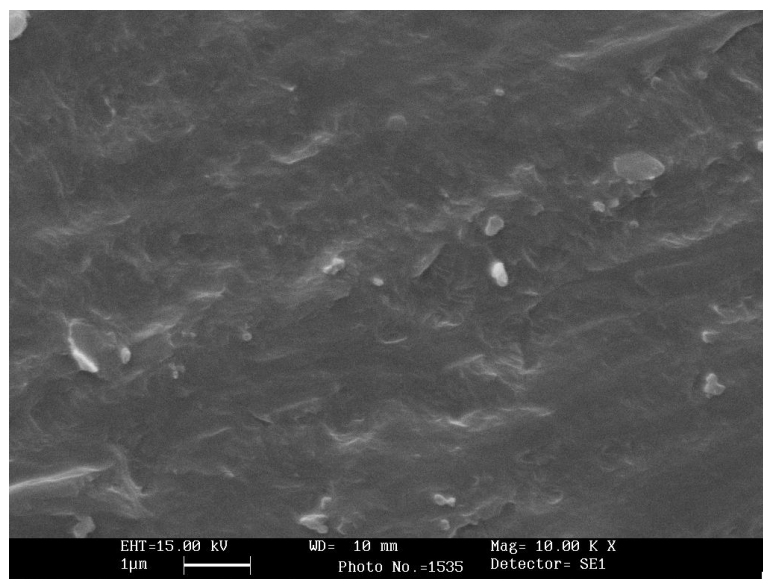
نمودار ۳- مقایسه پوشش های نانویی در میزان باقی ماندگی ذرات نانو از نظر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

تصویر ۱ و ۲ بررسی و ارزیابی پوشش های بسته بندی حاوی ۳٪ و ۵٪ نانو نقره توسط میکروسکوپ الکترونی با میزان بزرگنمایی ۱۰kX در مقیاس ۱ میکرومتر را نشان می دهد که به صورت کاملا همگن مشاهده شده و

پراکنش ذرات در تصویر به صورت یکدست مشاهده می گردد. سایز متوسط ذرات نقره حدود ۸۶ نانومتر گزارش شد.



تصویر ۱- میکروسکوپ الکترونی پوشش بسته بندی حاوی ۳٪ ذرات نانو نقره



تصویر ۲- میکروسکوپ الکترونی پوشش بسته بندی حاوی ۵٪ ذرات نانو نقره

بحث

در حال حاضر بسته بندی غذا به خصوص بر روی کنترل و تنظیم متمرکز شده و در تکنولوژی های پیشرفته بسته بندی با استفاده از نانو موادی هوشمند انجام می شود که می توانند نسبت به شرایط محیطی پاسخ دهند، خود را

ترمیم کنند و مصرف کننده را نسبت به آلودگی یا حضور پاتوژن آگاه کنند از این رو بسته بندی های هوشمند در صنایع غذایی به محض شروع فساد در ماده غذایی در داخل بسته از خود ماده نگهدارنده آزاد کرده و تغییرات دمایی، نفوذ رطوبت و خروج مایعات را از ماده غذایی داخل بسته تشخیص داده و به مصرف کننده اعلام می کنند. کاربرد نانو در بسته بندی های فعال کاملاً مشهود است چون در این بسته بندی ها مهم ترین نگرانی در مورد جذب و مصرف اکسیژن است به علاوه خاصیت ضد میکروبی هم برای این نوع بسته بندی بسیار مهم است که محصولات نانو به خوبی به این نیاز پاسخ می دهند (Timothy & Duncan, 2011). فیلم های نانو زمان ماندگاری محصول را افزایش می دهند از این رو می توانند باعث هدر رفت کم تر شده و به محیط زیست کمک می کنند از طرفی این فیلم ها به علت داشتن ضخامت اندک از انعطاف پذیری بالاتری نسبت به فیلم های معمولی برخوردارند این نازکی در شفافیت این فیلم ها مؤثر است و به زیبایی محصول کمک می کند اما نازکی این فیلم ها بدین معنا نیست که از مقاومت و استحکام برخوردار نیستند بلکه از فیلم های معمولی هم محکم ترند (Huang & Chen, 2012).

با توجه به ویژگی های ضد میکروبی نانو کامپوزیت ها یکی از مهم ترین کاربردهای آنها در ساختار پلیمرهای بسته بندی غذایی می باشد که موجب بهبود خواص نگهداری، خواص ممانعت کنندگی و بهبود مقاومت مرزی اکسیژن و دی اکسید کربن در بطری های پلی اتیلن ترفتالات و دیگر ظروف پلاستیکی بسته بندی می شود (Martinez-Abad et al., 2012, Tankhiwale & Bajpai, 2012).

در کشور ما نیز کاربرد پوشش های بسته بندی حاوی نانو ذرات در صنعت غذا و دارو به دلیل مزایای سلامتی و بهداشتی آن مورد توجه واقع شده است که در این راستا پوشش های بسته بندی حاوی ماده مؤثره نقره در محصولات غذایی رواج بسیاری داشته است چرا که نقره دارای خاصیت آنتی باکتریال می باشد (ولی پورمطلق و همکاران ۱۳۸۷).

نتایج بدست آمده در این پژوهش خاصیت ضد میکروبی پوشش های حاوی ذرات نانو نقره در برابر باکتری های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس را نشان داد و بررسی سایز ذرات، نحوه پراکنش ذرات و بررسی ساختار و مورفولوژی ذرات نانو نقره از میکروسکوپ الکترونی نیز حاکی از آن بود سایز نانو ذرات نقره در پوشش های ۱٪، ۳٪ و ۵٪ کمتر از ۱۰۰ نانومتر است که این نتایج با یافته های **Akbar & Kumar Anal** در سال ۲۰۱۴ در خصوص اثر ضد میکروبی بسته بندی فعال نانوذرات اکسید روی در برابر سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت مرغ آماده مصرف و همچنین بررسی اندازه و ساختار نانو ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی و گزارش بدست آمده مبنی بر کمتر بودن اندازه ذرات از ۱۰۰ نانومتر همخوانی داشت.

Patiño و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضد میکروبی ذرات نقره-روی را در پوشش های کامپوزیت پلی آمید حاوی این ذرات به عنوان بسته بندی سوسیس ها با هدف مهار سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028) مورد بررسی قرار دادند و نتایج گزارش شده مشابه نتایج بدست آمده در خصوص اثر ضد میکروبی ذرات نانو نقره در پژوهش حاضر بود.

میزان اثر گذاری بسته بندی کالباس خشک در پوشش های نانویی بر زمان ماندگاری به میزان ۲ برابر بسته بندی های رایج گزارش گردید در نتیجه ای مشابه **Cachaldora و همکاران** در سال ۲۰۱۳ که اثر بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده با نسبت های متفاوت اختلاط سه گاز $O_2:N_2:CO_2$ و بسته بندی در خلأ را بر روی ماندگاری مورسیلا مورد ارزیابی قرار داده بودند زمان ماندگاری مورسیلا بیشتر از ۸ هفته برای تمام شرایط بسته بندی (افزایش زمان ماندگاری به میزان ۲ برابر نسبت به بسته بندی رایج) اعلام شد ولی در مقایسه معنی داری میزان اثر گذاری میان بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده، بسته بندی در خلأ ($P < 0.05$) و بسته بندی در پوشش های حاوی ذرات نانو نقره ($p = 0.034$) پوشش های نانویی کارآمدتر نشان دادند.

نتایج مشابهی در مقایسه پژوهش حاضر که بسته بندی حاوی ذرات نانو نقره به دلیل اثر میکروب کشی ذرات نانو نقره در مقابل باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به عنوان بسته بندی ضد میکروبی معرفی شده و منجر به حفظ کیفیت کالباس خشک و اثر گذاری ذرات نانو بر افزایش زمان ماندگاری کالباس خشک گردید با یافته های **Marcos و همکاران** در سال ۲۰۱۳ که اثر بسته بندی ضد میکروبی فیلم های PVOH^۳ حاوی نایسین را بر روی کاهش مقدار لیستریا مونوسیتوزنز در سوسیس تخمیری بررسی نمودند و یافته های خواجه علی و همکاران در سال ۱۳۹۱ که اثر نایسین و بسته بندی اتمسفر اصلاح شده را بر روی کاهش رشد باکتری های مزوفیل، سرماگراهای هوازی و اسید لاکتیک در سوسیس امولسیون و افزایش زمان ماندگاری آن مورد بررسی قرار دادند، بدست آمد.

در تحقیقی **اسمعیلی** در سال ۱۳۹۲ اثر استفاده از پوشش های بسته بندی حاوی ۳٪ و ۵٪ نانو نقره را بر بار میکروبی مرغ های عرضه شده در طول ۴۸ ساعت اولیه از کشتارگاه بررسی نمود. نتایج مشابه با پژوهش انجام گرفته بر روی کالباس گزارش شد که نشان از مؤثر واقع شدن پوشش های حاوی ذرات نانو نقره در افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت محصول غذایی داشت.

³. PVOH: Polyvinyl alcohol

همچنین شریفی سلطانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به نتایج مشابهی در جهت افزایش عمر نگهداری فیله مرغ از طریق بسته بندی در فیلم های نانوقره در دمای یخچال (3 ± 1 سانتیگراد) و کاهش رشد باکتری های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس و افزایش زمان ماندگاری فیله مرغ از ۲ روز در بسته بندی رایج به ۷ روز در بسته بندی نانو نقره رسیدند.

یافته های فروغی و همکاران در سال ۱۳۹۰ نیز در راستای نتایج تحقیق بر روی نمونه کالباس خشک و در خصوص بررسی اثرات استفاده از پوشش نانو در افزایش عمر ماندگاری فرآورده غذایی سوسیس کوکتل حاکی از تأثیر مثبت پوشش نانو در افزایش عمر ماندگاری فرآورده های گوشتی بوده و به طور کلی نتایج آن معنی دار ($p < 0.05$) گزارش گردید.

به عنوان هدف دوم تحقیق میزان باقی ماندگی نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان باقی ماندگی در نمونه ها کمتر از ۳ ppm بود. تجزیه و تحلیل نتایج معنی دار و $p = 0.018$ گزارش گردید. در این راستا اهری و همکاران در سال ۱۳۹۱، میزان باقی ماندگی ذرات نانو در محصول بسته بندی شده نهائی زعفران را بررسی نمودند و نتایج حاکی از باقی ماندگی کمتر از ۱ ppm در نمونه ها بود.

نتایج تحقیق بر روی کالباس خشک مشابه تحقیق امامی فر و همکاران در سال ۱۳۹۰ که نانو کامپوزیت هایی از پلی اتیلن سبک و نانو ذرات نقره را به عنوان بسته بندی برای آب پرتقال تازه استفاده کردند، نشان از معنی دار بودن اثر نانو ذرات بر کاهش جمعیت میکروبی ($p < 0.05$) داشت که در نمونه های کالباس $p = 0.025$ بدست آمد.

به عنوان هدف در پژوهش انجام شده زمان ماندگاری کالباس به هنگام استفاده از پوشش های بسته بندی حاوی ذرات نانو نقره با پوشش های رایج مصرفی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان دهنده افزایش عمر مفید نگهداری کالباس خشک از ۱ ماه به ۲ ماه و منتج از کاهش بار میکروبی به طور معنی دار ($p = 0.025$) بود.

نتیجه گیری

بررسی های انجام گرفته از این تحقیق نشان داد که در مقایسه ای میان پوشش های بسته بندی حاوی ۳٪ و ۵٪ ذرات نانو نقره، پوشش های ۵٪ کارآمدتر نشان داد بدین ترتیب که به هنگام استفاده از پوشش های حاوی

۵٪ ذرات نانو نقره نسبت به پوشش های ۳٪ و شاهد تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به میزان ۷۸٪ کاهش یافت.

پوشش نانویی ۵٪ به عنوان کارآمدترین پوشش در جهت کاهش بار میکروبی و افزایش زمان ماندگاری کالباس خشک شناخته شده و نتایج نشان دهنده افزایش زمان ماندگاری کالباس خشک به میزان ۲ برابر بود. پوشش بسته بندی ۱٪ در عمل تفاوتی با نمونه شاهد نداشت از این رو در نتایج بررسی نگردید.

منابع

استاندارد ملی به شماره ۲۹۴۶ : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جستجو و شمارش اشرشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی.

استاندارد ملی به شماره ۵۲۷۲ : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش کلی میکروارگانسیم ها در ۳۰ سلیسیوس.

استاندارد ملی به شماره ۶۸۰۶-۳ : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه ها)، قسمت سوم : جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانسیم.

استاندارد ملی به شماره ۸۹۲۳-۲ : میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - آماده سازی آزمایش، سوسپانسیون اولیه و رقت های اعشاری برای آزمون میکروبیولوژی - قسمت دوم - مقررات ویژه برای آماده سازی گوشت و فرآورده های آن.

اسمعیلی م. ۱۳۹۲. مطالعه بار میکروبی مرغ های عرضه شده در طول ۴۸ ساعت اولیه از کشتارگاه کوشان طیور استان تهران و استفاده از پوشش های بسته بندی نانو نقره در مقایسه با شستشوی کلوئید نقره. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد دامغان.

امامی فرا، کدیور م، شاهدی م، سلیمانیان زاد ص. ۱۳۹۰. ارزیابی اثر بسته بندی های نانوکامپوزیتی حاوی نقره و اکسید روی بر عمر نگهداری آب پرتقال تازه. مجله ایران علوم تغذیه و صنایع غذایی. (۱) ۶۷-۵۷.

اهری ح، صادقی م، طلاکش ف، بیات م، شکری ا، انوار اع. ۱۳۹۱. بررسی اثر نانو ذرات نقره بر زمان ماندگاری زعفران ایرانی با استفاده از پوشش های بسته بندی نانو بر خواص میکروبی و رهایش ذرات نانو به محصول نهایی. مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای، علمی - پژوهشی، (۴)۹، ۸۰۲-۷۹۳

شریفی سلطانی م، اهری ح، نوراللهی ع م. ۱۳۹۱. افزایش عمر نگهداری فیله مرغ توسط فیلم های نانونقره در دمای یخچالی 3 ± 1 . دومین سمینار ملی امنیت غذایی.

کریم گ. ۱۳۸۲. آزمون های میکروبی مواد غذایی. تهران: دانشگاه تهران

فروغی س، مقدم آ، اهری ح. ۱۳۹۰. بررسی افزایش عمر ماندگاری فرآورده های غذایی با فن آوری پوشش های نانو. دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران. ۹(۲)، ۸۱-۸۶.

ولی پورمطلق ن، موسویان م ت، مرتضوی ع. ۱۳۸۷. تأثیر بسته های محتوی نانوذرات نقره بر مشخصه های میکروبی و ظاهری زرشک. نشریه پژوهش های صنایع غذایی ایران. ۵(۲)، ۸۷-۷۵.

Akbar A, Kumar Anal A. 2014. Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat poultry meat. *Food Control*;38:88-95

Busolo MA, Fernandez P, Ocio MJ, Lagaron JM. 2010. Novel silver-based nanoclay as an antimicrobial in polylactic acid food packaging coatings. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*;27(11):1617-26.

Cachaldora A, Garcia G, Lorenzo JM, García-Fontán MC. 2013. Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on some quality characteristics and the shelf-life of "morcilla", a typical cooked blood sausage. *Meat Science*;93(2):220-5.

Gezgin ZA, Lee TC, Huang Q. 2013. Engineering Functional Nano-Thin Multilayers on Food Packaging: Ice Nucleating Polyethylene Films. *Journal of agricultural and food chemistry*;61(21):5130-8

Huang E, Chen Y. 2012. Determination of the migration of seven photoinitiators in food packaging materials into aqueous solvent. *Chinese journal of chromatography, Zhongguo hua xue hui*;30(12):1235-40.

Martinez-Abad A, Lagaron J, Ocio MJ. 2012. Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications. *Journal of agricultural and food chemistry*;60(21):5350-9.

Patiño J, Henríquez L, Restrepo D, Mendoza M, Lantero M, García M. 2014. Evaluation of polyamide composite casings with silver–zinc crystals for sausages Packaging. *Food Packaging and Shelf Life*;1(1):3-9

Song H, Li B, Lin QB, Wu HJ, Chen Y. 2011. Migration of silver from nanosilver-polyethylene composite packaging into food simulants. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry ,analysis, control, exposure & risk assessment*; 28(12):1758-62.

Tankhiwale R, Bajpai SK. 2012. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*;90:16-20.

Timothy V, Duncan. 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*;363:1–24.

www.mashreghnews.ir, 31.2.93